

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-181758

(43)Date of publication of application : 05.07.1994

(51)Int.Cl.

C12N 9/00
C07H 21/02
C12N 15/00
C12N 15/11

(21)Application number : 05-217137

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 01.09.1993

(72)Inventor : OTSUKA EIKO
KOIZUMI MAKOTO

(30)Priority

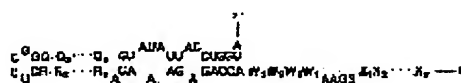
Priority number : 04236916 Priority date : 04.09.1992 Priority country : JP

(54) HAIR PIN TYPE RIBOZYME HAVING THERMODYNAMICALLY STABLE LOOP

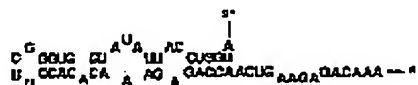
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new polyribonucleotide having in vivo high ribozyme cleaving activity.

CONSTITUTION: A polyribonucleotide containing a nucleotide sequence of formula I [S is adenine nucleotide or cytosine nucleotide; Q1 to Q2 are independently uracil nucleotide, adenine nucleotide, cytosine nucleotide or guanine nucleotide; R1 to Rn are nucleotides each complementary to Q1 to Qn; W1 to Wn are independently uracil nucleotide, adenine nucleotide, cytosine nucleotide or guanine nucleotide; X1 to Xn are independently uracil nucleotide, adenine nucleotide, cytosine nucleotide or guanine nucleotide; (m) and (n) are independently integer of 1-10] in the molecule. This polyribonucleotide can be synthesized by a DNA/RNA automatic synthesizer, e.g. from a nucleotide 3'-O-phosphoroamidite substance obtained by protecting 2'-hydroxy group of polyribonucleotide of formula II with tert.-butyldimethylsilyl group and protecting 5'hydroxy thereof with dimethoxytolyl group.



I



II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

21.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-181758

(43)公開日 平成6年(1994)7月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 N 9/00		9359-4B		
C 0 7 H 21/02				
C 1 2 N 15/00	A	9050-4B		
15/11	ZNA			

審査請求 未請求 請求項の数4(全 10 頁)

(21)出願番号 特願平5-217137

(22)出願日 平成5年(1993)9月1日

(31)優先権主張番号 特願平4-236916

(32)優先日 平4(1992)9月4日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 大塚 栄子

北海道札幌市中央区南十条西18-1-3-614号

(72)発明者 小泉 誠

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

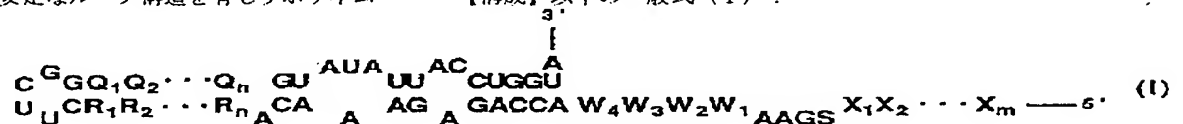
(54)【発明の名称】 熱力学的に安定なループを有するヘアピン型リボザイム

(57)【要約】 (修正有)

活性を有するポリリボヌクレオチドに関する。

【目的】熱力学的に安定なループ構造を有しリボザイム

【構成】以下の一般式(I):



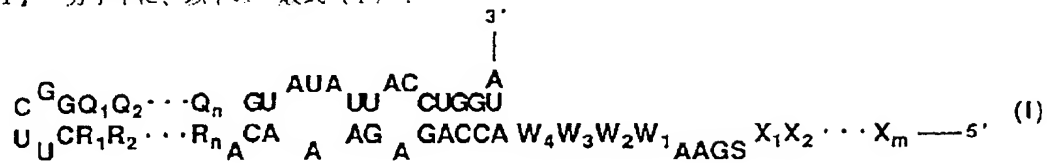
で示されるヌクレオチド配列から成るポリリボヌクレオチド(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド、又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ はウラシルヌクレオチドなどのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチ

ドを表し、 $W_1 \sim W_4$ はウラシルヌクレオチドなどのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ はウラシルヌクレオチドなどのいずれかを表し、 m, n は1~10の整数を表す。)等に関する。

【効果】当リボザイムを生体内に投与することにより、RNAに由来するエイズ等の疾患についての予防・治療効果が得られる。

【化1】

【請求項 1】 分子中に、以下の一般式（I）：



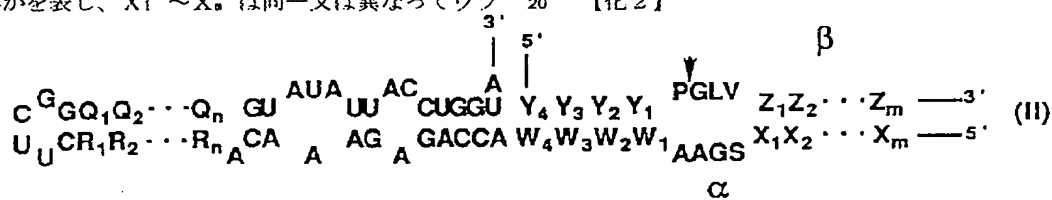
で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド（式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一又は異なってウラ

シルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 m 、 n は同一又は異なって $1 \sim 10$ の整数を表す。）。

【請求項2】請求項1記載の一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、nが3であるポリリボヌクレオチド。

【請求項3】以下の一般式(II)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド α を用いて、一般式(I)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド β を式中の矢印の部位において切断する方法：

【化2】



(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一又は異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一又は異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又は、グアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_4$ は $W_1 \sim W_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_n$ は $X_1 \sim X_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、m、nは同一又は異なつて1～10の整数を表す。)

【請求項4】請求項3記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドでnが3であるポリリボヌクレオチド α を用いて、LがウラシルヌクレオチドでVがシトシンヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド β を切断する方法。

【発明の詳細な説明】

{ 0 0 0 1 }

【産業上の利用分野】本発明は、熱力学的に安定なループ構造を有しリボザイム活性を有するポリリボヌクレオチド、該ポリリボヌクレオチドをコードするDNA、該DNAを含むことからなる発現ベクター、該発現ベクターをトランスフェクトした宿主細胞、及び、該リボザイム活性を有するポリリボヌクレオチドによる基質ポリリボヌクレオチドの特定部位の切断方法に関する。

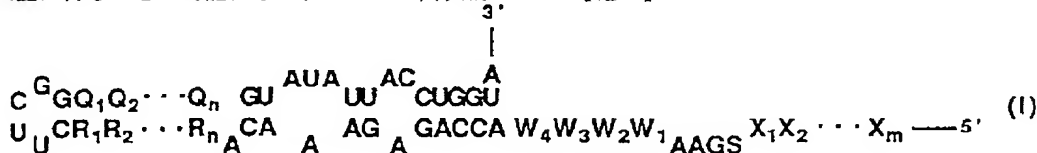
【0002】

【従来の技術】タバコリンダスポットウイルスのサテライトRNAの+鎖やアポカドサンプロッチウイロイドの+鎖や-鎖は、 Mg^{2+} 存在下自分自身の触媒活性で切断される(Science 231, 1577-1580(1986))。この切断活性に必要なRNAの構造が明らかにされ、ハンマーヘッド型リボザイムと名付けられた。(Nucleic Acids Res. 14, 3627-3640(1986))。このリボザイムを用いた標的RNAの配列特異的切断法も開発された(Nucleic Acids Res., 17, 7059-7071(1989))。

【0003】一方、タバコリングススポットウイルスのサテライトRNAの一鎖も切断反応を起こし、特定部位での切断が明らかにされた(Nature 323, 349-353(1986))。

又、近年この切断に必要なRNAの最小領域が明らかにされた。(Biochemistry, 28, 4929-4933(1989))。この触媒活性を持つRNAは50ヌクレオチドから成り、このRNA内にヘアピンループ構造を有するモデルが提唱され、ヘアピン型リボザイムと名付けられた。本発明者らや他の研究グループは、このヘアピン型リボザイムのヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し、切断反応に重要ないくつかのヌクレオチドを明らかにしている。(Nature 354, 320-322(1991), Nucleic Acids Res. 19, 6833-6838(1991))。また、最近Burkeらのグループでは、ランダムな変異をもつDNAとPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いたin vitro selectionによってヘアピン型リボザイムの切断反応と連結反応に重要な塩基配列を明らかにしている。(Gene & Development 6, 129-134(1992))。本発明者らは、ヘアピンループ部分を欠失したRNAでも触媒反応が進行することも明らかにしている(Nucleic Acids Res. 19, 6833-6838(1991))。

【0004】一方、近年のRNAの合成法の発展によりRNAを大量に得ることが可能になり、RNAの高次構



【0008】で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Q₁ ~ Q_nは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、R₁ ~ R_nはQ₁ ~ Q_nにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、W₁ ~ W₄は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニ

ンヌクレオチドのいずれかを表し、X₁ ~ X_mは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、m, nは同一又は異なって1~10の整数を表す。)に関し、好適には、

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、リボザイム内に1か所存在するヘアピンループのヌクレオチド配列が上記の熱力学的に安定な5'CUUCGG3'配列であるポリリボヌクレオチドを調製し、このポリリボヌクレオチドが高いリボザイム切断活性を有することを見出し、本発明を完成した。本発明におけるリボザイムは熱力学的に安定なヘアピンループ構造を有していることより、生体内で目的のポリリボヌクレオチドを効率よく切断することが期待される。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、

(1) 分子中に、以下の一般式(1)：

【0007】

【化3】

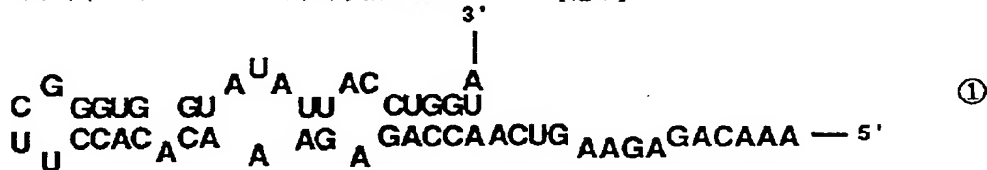
ンヌクレオチドのいずれかを表し、X₁ ~ X_mは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、m, nは同一又は異なって1~10の整数を表す。)に関し、好適には、

(2) (1)記載の一般式(1)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、nが3であるポリリボヌクレオチドである。

【0009】最適には、以下の化合物①及び④である。

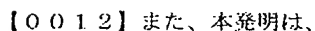
【0010】

【化4】



【0011】

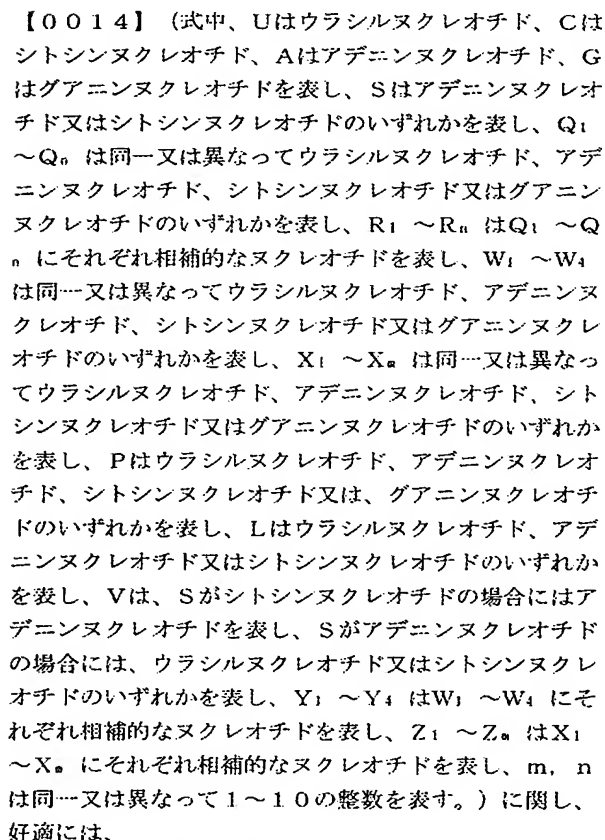
【化5】



を式中の矢印の部位において切断する方法：

【0013】

【仕6】



【００１５】本発明のポリリボヌクレオチドは高いリボザイム活性を有し（以下、「リボザイム・ポリリボヌクレオチド」という。）、細胞中で一定の配列を有するポリリボヌクレオチドを特異的に切断する能力を有する。

したがって、植物・動物又は人体を問わずこれらの生体に悪影響をもたらすポリリボヌクレオチドが存在する場合には、リボザイム・ポリリボヌクレオチドを用いた生体内にて特異的に該ポリリボヌクレオチドを切断することが可能である。

【００１６】本発明のＤＮＡは、本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドをコードするものであり、好適なバクテリアを用いて細胞内に取り込ませることにより所望のポリリボヌクレオチドを特異的に切断する能力を有する。対象とする細胞は、植物・動物又は人体を問わない。

【0017】また、本発明の切断方法のうち、好適には
(4)記載の切断方法である。 本発明の前記一般式

(I) 又は(II)で示される化合物は、塩の形で使用することができる。そのような塩としては、例えばナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属；カルシウムのようなアルカリ土類金属；アンモニア；リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸；トリエチルアミンのようなアルキルアミン類；などの無機塩又は有機塩を挙げることができる。

【0018】本発明のポリリボヌクレオチドは、American Bionetics社より購入した、2'-水酸基をtert-ブチルジメチルシリル基、5'-水酸基をジトメキシトリチル基で保護したヌクレオシド3'-O-ホスホロアミダイト体を用いて、Applied Biosystem社のDNA/RNA自動合成機により所望の配列のものを合成することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5764-5768, (1988))。

【0019】リン酸基についた β -シアノエチル基の除去、ポリリボヌクレオチド鎖の担体からの切り出し及び塩基部のアシル基の除去をアルカリ処理により行い、テトラブチルアンモニウムフルオリド処理により2'-水酸基の保護基を除去し、酸処理を行って5'-水酸基の保護基を除去する。これに続く脱塩処理、逆相およびイ

オン交換クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィーを含む。）等の各種クロマトグラフィーなど、通常の核酸精製に用いられる精製操作で精製することにより、前記一般式（I）又は（II）に示される化合物を得ることができる。

【0020】リボザイム・ポリリボヌクレオチドによる基質ポリリボヌクレオチド鎖のinvitro 切断反応は、以下の操作により行うことができる。

【0021】基質として用いるポリリボヌクレオチドの5'末端をラジオアイソトープ等で標識する。この標識ポリリボヌクレオチドに対し、塩化マグネシウム含有緩衝液中にてリボザイム・ポリリボヌクレオチドを加え加温する。

【0022】反応温度は、0～100℃が好適であり、さらに好適には30～50℃である。

【0023】一定時間後、反応液中にEDTAを加えることにより反応を停止させ、この溶液についてホモクロマトグラフィーを行う。切断生成物をFujiiバイオイメージアナライザーBAS 2000システムで定量することにより切断率を算出することができる。

【0024】リボザイム・ポリリボヌクレオチドをコードするDNA鎖は、Applied Biosystems 社DNA自動合成機により合成することができる。得られたDNAの配列決定は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法（Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980): "Methods in Enzymology" 65, 499-559）やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法（Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276）等により行なうことができる。

【0025】また、このDNA鎖をアニーリングすることにより二本鎖とし、DNAリガーゼを用いて細胞内で作用するプロモーターの支配下に該二本鎖DNAを連結し、発現ベクターを構築することができる。

【0026】この発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより、本発明の宿主細胞を得ることができ、また、同時に本発明の発現ベクターを量産することができる。

【0027】宿主細胞としては以下のものが例示される。

【0028】原核細胞の宿主細胞としては、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）や枯草菌（*Bacillus subtilis*）等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主細胞と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点及び調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞をトランスフェクトさせればよい。また、ベクターはトランスフェクトされた細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を持つものが好ましい。

【0029】例えば、大腸菌としては、*E. coli* K12株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、本発明ではこれらに限定されず、公知の各種の菌株及びベクターがいずれ

も利用できる。

【0030】プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン（*trp*）プロモーター、ラクトース（*lac*）プロモーター、トリプトファン・ラクトース（*tac*）プロモーター、リボプロテイン（*lpp*）プロモーター、バクテリアファージ由来のラムダ（ λ ）P.L.プロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu（*tufB*）プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドの産生に使用することができる。

【0031】枯草菌としては、例えば、207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB28（Ohmura K., et al., (1984), J. Biochem., 95, 87-93）等が用いられるが、本発明はこれらに限定されない。

【0032】プロモーターとしては、枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられる。

【0033】真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、マウスの細胞であるNIH-3T3細胞（J. Virol., 4, 549-553, (1969)）、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman Y., (1981), Cell, 23, 175-182）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO）のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株（Urbaub G. and Chasin, L.A., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220）等がよく用いられているが、本発明は、これらに限定されない。

【0034】脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライシング部位、ポリアデニル化部位及び転写終結配列等を有するものを使用でき、これらはさらに必要に応じて複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr（Subramani S. et al. (1981), Mol. Cell. Biol., 1, 854-864）等を例示できるが、本発明はこれらに限定されない。

【0035】また、真核微生物としては酵母も使用し得る。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター（Benetzen J. and Hall B.D., (1982), J. Biol. Chem., 257, 3018-3025）や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター（Miyahara A. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1-5）等を使用できる。

【0036】このようにして得られたベクターを導入させることにより他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

【0037】宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いる

ことができる。該発現ベクターはカルシウムクロライド法(Mandel M. and A. Higa J. Mol. Biol. 53, 154, (1970)), Hanahan の方法(Hanahan D. and M. Meselson, Gene, 10, 63, (1980))及び電気パルス穿孔法(Neumann E. et al., (1982)EMBO J. 1, 841-845)等により大腸菌に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0038】上記で得られる所望のベクターがトランスフェクトされた細胞は、常法に従い培養することができる。該培養により細胞内に所望のリボザイム・ポリリボヌクレオチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものが適宜選択でき、例えば、上記大腸菌であればトリプトン・イースト培地(バクトトリプトン1.6%、イーストエキストラクト1.0%、NaCl 10.5%、(pH7.0))やペプトン培地(DIFCO社)等を使用できる。

【0039】また、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナル及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983)Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973)Virology 52, 456-457)及び電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982)EMBO J. 1, 841-845)等によりCOS細胞に取込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0040】また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSV neo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982)J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドを安定に産生するトランスフェクト細胞を得ることができる。

【0041】上記で得られる所望のベクターがトランスフェクトされた細胞は、常法に従い培養することができる。該培養により細胞内にリボザイム・ポリリボヌクレオチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。

【0042】本発明は、また、リボザイム・ポリリボヌクレオチドを用いて、基質ポリリボヌクレオチドを特異

的に切断する方法に関する。本発明の方法を生体内で実施することにより、生体に悪影響をもたらすポリリボヌクレオチドを特異的に切断することが可能になる。

【0043】

【作用】本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドは、動物や植物、又は人体に薬理上使用できる担体とともに直接投与することが可能である。それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、坐薬などによる非経口投与をあげることができる。

【0044】また、本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドはリボソーム等の運搬体中に封入し投与することも可能である。

【0045】その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.1mg ないし1000mgであり、これらを1回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回0.1mg ないし1000mgを皮下注射、筋肉注射、又は静脈注射によって投与することができる。

【0046】また、本発明のDNAを好適なベクターに組み込み該ベクターを生体に投与することにより、細胞内でリボザイム・ポリリボヌクレオチドを発現せしめ本発明の効果をすることも可能である。そのようなベクターとして、レトロ・ウイルスやワクシニア・ウイルスが例示できる。

【0047】さらに、植物・動物やヒトの生体より細胞を摘出し、該細胞に本発明の発現ベクターをトランスフェクトして培養し、細胞内にて所望のリボザイム・ポリリボヌクレオチドを産生する能力を賦与した後に、このトランスフェクトされた細胞を元の生体に移植して、特定のポリリボヌクレオチドに対する耐性を該生体にもたらしことも可能である。この方法を利用することにより、例えば、ヒト生体を、エイズ等の特定の疾患に関連するポリリボヌクレオチドや、癌遺伝子に関連するポリリボヌクレオチドに対して耐性にするのが可能である。

【0048】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

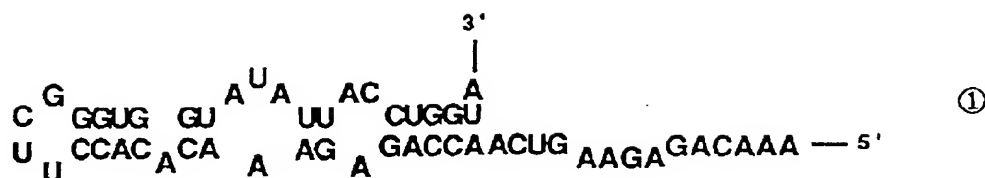
【0049】実施例1

ポリリボヌクレオチドの合成

5'-水酸基がジメトキシトリチル基、2'-水酸基がtert-ブチルジメチルシリル基で保護されたヌクレオシド3'-ホスホロアミダイト(アメリカン・バイオティン社より購入)を用いて、DNA自動合成機(Applied Biosystems社製 394 DNA/RNA synthesizer)で以下のポリリボヌクレオチド①を合成した。

【0050】

【化7】



【0051】RNA断片は1 μ mol スケールで合成した。

【0052】合成終了後、合成したオリゴスクレオチドが結合したCPG (Controlled PoreGlass) を濃アンモニア水：エタノール (3 : 1 v/v) 混液で室温1時間処理をし、溶媒を留去後、5 mlのエタノール性飽和アンモニアを加え、55℃で16時間加熱した。溶媒を留去し、残った溶液に1 mlの1 M TBAF (Tetrabutylammonium fluoride)/THF (Tetrahydrofuran) 溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これに5 mlの0.1 M Triethylammonium acetate (pH7.0) を加えた後、C18シリカゲル (ウォーターズ社製) カラムクロマトグラフィーを行なった (カラムサイズ0.7 × 15 cm : 5-40% CH₃CN, 50 mM Triethylammonium bicarbonate の溶媒をもちいた濃度勾配により溶出)。約30%濃度のCH₃CNで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、5 mlの0.01 N HClを加え、1時間攪拌した。0.1 Nアンモニア水で中和後、水層を酢酸エチルで洗浄

し、溶媒留去後滅菌水1.2ml に溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相HPLC、イオン交換HPLCで分離し精製した。

【0053】逆相HPLCは、Inertsil ODS-2(φ10×250mm GLサイエンス社製)カラムを用い、A溶液として5%CH₃CNを含む0.1 M Triethylammonium acetate(pH7.0)、B溶液として25%CH₃CNを含む0.1 M Triethylammonium acetate(pH7.0)を用い、直線濃度勾配法により行った。

【0054】また、イオン交換HPLCはTSKgel DEAE 2SW (φ4.6 × 250mm 東ソー(株)製)カラムを用い、A溶液として20%CH₃CN/H₂O、B溶液として20%CH₃CNを含む2M HCOONH₄溶液を用い、直線濃度勾配法により行った。ポリリボヌクレオチド①についての逆相HPLC及びイオン交換HPLC溶出に用いたB溶液のパーセントと保持時間を以下の表1に示す。

【0055】

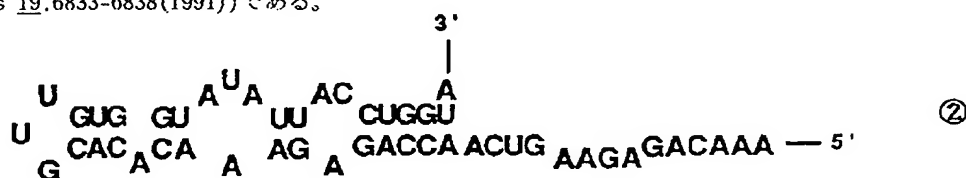
【表 1】

種類	B%	直線濃度勾配の全時間	保持時間
逆相HPLC	: 10% → 50%	20分	18.1 分
イオン交換HPLC	: 30% → 50%	20分	20.0 分

【0056】また以下のポリリボヌクレオチド②、③はすでにSekiguchi らによって報告されているもの(Nucleic Acids Res 19,6833-6838(1991))である。

【 0 0 5 7 】

【化8】



[0 0 5 8]

【化9】

5' UGACAGUCCUGUUUC 3'

③

【0059】 实施例2

基質ポリリボヌクレオチド③の5'末端標識

前述のポリリボヌクレオチド③(100pmol) に $[\gamma$ -³²P] ATP (0.5 μ l, 5 μ Ci)、緩衝液(1 μ l, 2.5 mM Tris-HCl (pH7.6)、5.0 mM塩化マグネシウム、5.0 mM 2-メルカプトエタノール)、T4ポリリボヌクレオチドキナーゼ(0.5 μ l, 1単位 宝酒造(株))、滅菌水(3 μ l)を加え、37℃1時間保温した。NENSORB20(Dupont

社)を用いて、未反応の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と塩を除いた。これを滅菌水に溶解し、5' 標識オリゴヌクレオチドを得た。

【0060】实施例3

基質ポリリボヌクレオチドの切断

基質ポリリボヌクレオチド③に対するポリリボヌクレオチド①又は②の切断反応は次のように行った。

【0061】5'末端を標識した③(1.62 pmol)を10

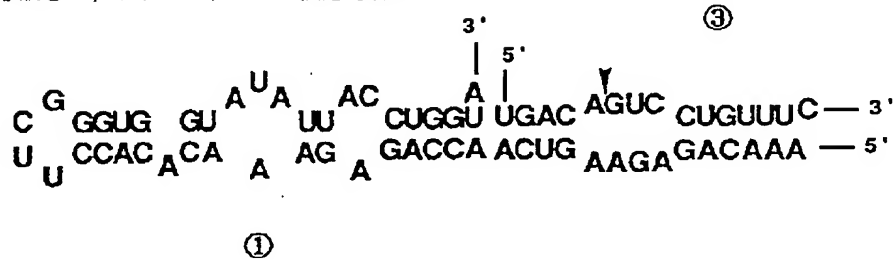
μ l の緩衝液(40mM Tris-HCl (pH7.5) 12mM MgCl₂, 2mM スペルミジン 3HCl)に溶解し、またリボザイム側のポリリボヌクレオチド①又は②(0.64 pmol) も10 μ l 同緩衝液に溶解後それぞれを65℃で2分間加温後水冷した。そしてリボザイム側の溶液を基質側に加えることで反応を開始した。

【0062】一定時間経過時に50mM EDTAが2 μ l 入った溶液中に反応液を2 μ l サンプリングし反応を停止

させ、基質分解の経時変化を観察した。ホモクロマトグラフィーで切断生成物を分離し、切断率をバイオイメージアナライザー-BAS2000 システム(フジフィルム社(株)製)を用いて求めた。それぞれの反応様式を以下に示す。

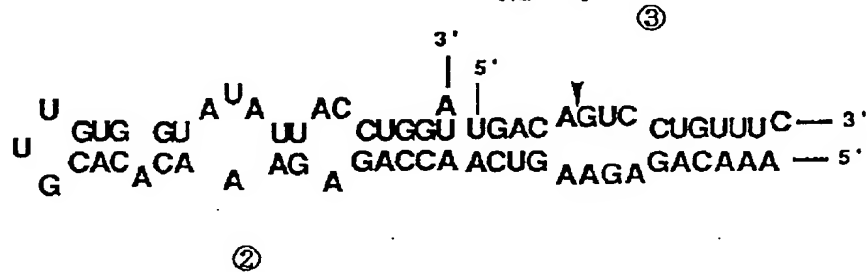
【0063】

【化10】



【0064】

【化11】



【0065】反応温度が42℃の場合の結果を図1に示した。

【0066】③のポリリボヌクレオチドは天然型の塩基配列をもつ②によって切断されることはすでに報告されている(Nucleic Acids Res.19,6833-6838(1991))。

【0067】図1においてレーン6は反応前の③である。レーン1-5は、②によって③を切断したものであり、レーン7-11は①によって③を切断したもので、それぞれ3, 9, 12, 15, 18分後の切断生成物を示している。

【0068】切断された断片は鎖長が短くなるため、未切断の③よりもホモクロマトグラフィーにおいて早く展開され、図1では、未切断の③の位置よりも上の位置に示される。

【0069】また、③の基質の半分が①または②によって切断される時間($t_{1/2}$)を求めた。32, 37, 47℃においても切断反応を用い、これらの結果をあわせて表2に示した。

【0070】

【表2】

温度(℃)	①を用いた場合の $t_{1/2}$ (分)	②を用いた場合の $t_{1/2}$ (分)
32	15	24
37	4	8
42	2	10
47	8	54

【0071】表2に示したようにリボザイム・ポリリボヌクレオチドの配列内に5'CUUCGG3'の熱力学的に安定な

ループを導入したもの(①)は天然型(②)のものに比べ32℃~47℃の温度において切断活性が上昇した。

【0072】実施例4.

Human immunodeficiency virus(HIV)RNAの塩基配列を持つ基質ポリリボヌクレオチドを切断するポリリボヌクレオチド④の合成

5'-水酸基がジメトキシトリチル基、2'-水酸基がtert-ブチルジメチルシリル基で保護されたヌクレオチド3'-ホスホロアミダイト(日本ミリポア・リミテッド)を用いて、DNA自動合成機(日本ミリポア・リミテッドCyclone Plvs DNA/RNA synthesizer)で以下のHIV RNAの塩基配列を持つ基質ポリリボヌクレオチドを切断するポリリボヌクレオチド④を合成した。

【0073】RNA断片は1 μ molスケールで合成した。

【0074】合成終了後、合成したオリゴヌクレオチドが結合したCPG(Controlled Pore Glass)を濃アンモニア水:エタノール(3:1v/v)混液で室温2時間処理をし、更に55℃で16時間加温した。溶媒を留去し、残渣に1mlの1M TBAF(Tetrabutylammonium fluoride)/THF(Tetrahydrofuran)溶液を加え、室温で24時間撹拌した。これに5mlの0.1M triethylammonium acetate(pH 7.0)を加えた後、C18シリカゲル(ウォーターズ社製)カラムクロマトグラフィーを行なった(カラムサイズ1.5 \times 12cm:20-40%CH₃CN, 50mM Triethylammoniumbicarbonate 水溶液の溶媒を用いた濃度勾配により溶出)。約30%濃度のCH₃CNで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、5mlの0.01N HClを加え、1時間撹拌した。

5' GUGCCCGUCUGUUGUGUGA 3' ⑤

【0079】

【化13】

5' GUCUGUUGUGUGA 3' ⑥

【0080】⑤のポリリボヌクレオチドはヘアピン型リボザイムの切断反応の基質として後述の実験に供した。また⑥のポリリボヌクレオチドは、リボザイム切断反応

0.1Nアンモニア水で中和後、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後滅菌水3mlに溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドをイオン交換HPLCで分取後、さらに逆相HPLCで分取し、精製した。

【0075】イオン交換HPLCはTSKgel DEAE 2SW(4.6 \times 250mm,東ソー(株)製)カラムを用い、A溶液として20%CH₃CN/H₂O、B溶液として20%CH₃CNを含む2M HCOONH₄水溶液を用い直線濃度勾配法により行なった(B%20 \rightarrow 60%(20分))。ポリリボヌクレオチド④は20.63分に溶出された。

【0076】逆相HPLCはInertsil ODS(6.0 \times 150mm,GLサイエンス社製)カラムを用い、A溶液として5%CH₃CNを含む0.1M Triethylammonium acetate(TEAA,pH 7.0)、B溶液として25%CH₃CNを含む0.1M TEAA(pH7.0)を用い、直線濃度勾配法により行なった(B%20 \rightarrow 60%(20分))。ポリリボヌクレオチドは18.23分に溶出された。

【0077】参考例1.

HIV RNAの塩基配列を持つポリリボヌクレオチドの合成
HIV RNAの塩基配列を持つポリリボヌクレオチド⑤(文献Nature 313,450-458(1985)記載のヌクレオチド番号106から124までの19量体)、⑥(上記文献記載のヌクレオチド番号112から124までの13量体)を実施例4記載の方法に従い合成し分取、精製した。

【0078】

【化12】

で生成する化合物として後述の実験に供した。

【0081】⑤、⑥のポリリボヌクレオチドについてのイオン交換HPLC溶出に用いたB溶液のパーセントと保持時間と逆相HPLC溶出に用いたB溶液のパーセントと保持時間を以下の表3に示す。

【0082】

【表3】

種類	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
⑤ 逆相HPLC	10% \rightarrow 50%	20 分	14.8 分
イオン交換HPLC	10% \rightarrow 60%	20 分	19.1 分
⑥ 逆相HPLC	10% \rightarrow 50%	20 分	12.2 分
イオン交換HPLC	イオン交換HPLCは行なわなかった。		

実施例5.

リボザイム活性を有するポリリボヌクレオチドによるHIV RNAの塩基配列を持つポリリボヌクレオチドの切断
ポリリボヌクレオチド⑤に対するポリリボヌクレオチド④の切断反応は次のように行なった。

【0083】基質ポリリボヌクレオチド⑤(250pmol)を100 μ lの緩衝液(40mM Tris-HCl(pH 7.5),

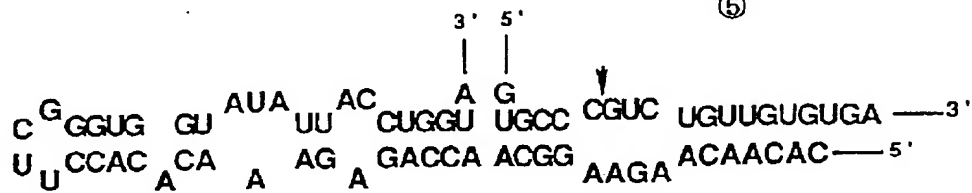
1.2mM MgCl₂, 2mM スペルミジン \cdot 3HCl)に溶解し、また、リボザイム側のポリリボヌクレオチド④(12.5pmol)を100 μ lの同緩衝液に溶解した。それぞれを65℃で2分間加温後氷冷した。そして、リボザイム側の溶液を基質側に加えることで反応を開始した。37℃で1時間加温し、50mMEDTAを50 μ l加えて停止後、逆相HPLC(Inertsil ODS, 6.0 \times 150mm, A溶

液；5%CH₃CN, 0.1M TEAA(pH7.0) B溶液；25%CH₃CN, 0.1M TEAA(pH7.0), B%；10%→50%/20分, 直線濃度勾配, 流速1ml/min) で切断反応に関し

て分析した。それぞれの反応様式について以下に示す。

【0084】

【化14】



④

【0085】ポリリボヌクレオチド⑤に対してポリリボヌクレオチド④を上記の条件で反応させた場合、逆相HPLCにおいてポリリボヌクレオチド⑤のピークの減少が観測された。これに対して12.2分のピークが出現した。このピークは、ポリリボヌクレオチド⑥と保持時間が一致したことから目的の位置で切断されたことを確認した。また切断反応後のポリリボヌクレオチド⑤及び出現した12.2分のピークのHPLCから得られた面積値より97%が切断された。

【0086】

【発明の効果】本発明のリボザイム・ポリヌクレオチド

を直接体内に投与することにより、あるいは、これをコードするDNAを好適なベクターに組込み生体内に投与することにより、生体に悪影響をもたらす天然のポリリボヌクレオチド又はRNAを特異的に切断することが可能になる。したがって、本発明により、RNAに由来するエイズや各種腫瘍等の疾患についての予防・治療効果が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】ホモクロマトグラフィーによる基質ポリリボヌクレオチドの解析図

【図1】

